

شناسایی و بررسی مولکولی جدایه‌ای از ویروس زردی چغندر قند (*Beet yellows virus*) در استان خراسان رضوی

محدثه گرامی^{۱*} - محسن مهرور^۲ - محمد زکی عقل^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۱۹

چکیده

به منظور شناسایی و بررسی مولکولی ویروس زردی چغندر قند (*Beet yellow virus, BYV*) در سال ۱۳۹۲ از مزارع چغندر قند استان خراسان رضوی، تعداد ۴۸ نمونه برگ درای علائم از مزارع عمده این محصول در این استان، جمع‌آوری شد. این علائم شامل زردی، رگبرگ روشنی، کوتولگی، ضخیم و شکننده شدن برگ بود. نمونه‌های جمع‌آوری شده توسط آزمون مولکولی PCR-RT مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمون با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، قطعه‌ای به طول ۶۱۵ bp مربوط به پروتئین پوششی ویروس تکثیر گردید. وجود این ناحیه تکثیر شده در نمونه‌های آلوده، نشان از آلودگی به ویروس مذکور را در مناطق بررسی شده دارد. قطعه تکثیر شده مربوط به جدایه‌ای از سبزار (*S-J*) از ژل استخراج و تعیین توالی گردید. نتیجه تعیین توالی و مقایسه توالی به دست آمده با جدایه‌های موجود در بانک ژن به وسیله نرم افزار DNAMAN7 مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج نشان داد که جدایه تعیین توالی شده دارای ۹۴-۸۵ درصد شباهت با جدایه‌های موجود در بانک ژن است. بیشترین درصد تشابه جدایه مورد بررسی در سطح نوکلئوتیدی (۹۴/۷۹ درصد) و آمینو اسیدی (۹۰/۵۹ درصد)، با جدایه‌ای از اوکراین (شماره دسترسی X73476) بود. بررسی‌های فیلوژنتیکی به کمک نرم افزار MEGA5.2 انجام شد.

واژه‌های کلیدی: ویروس زردی، چغندر قند، خراسان رضوی، ایران

مقدمه

(۶ و ۱۴). ORF1a پروتئینی ۲۹۵ کیلودالتونی، با ماهیت متیل ترانسفراز و هلیکازی تولید می‌کند که بزرگ‌ترین محصول ژنومی این ویروس است (۱۰ و ۱۱). ORF1b، RNA-dependent RNA-Polymerase را که یک پروتئین ۵۳ کیلودالتونی است را کد می‌کند (۴). ORF2 ویروس تولید پروتئینی ۶/۴ کیلودالتونی را بر عهده دارد که در حرکت سلول به سلول ویروس در گیاه نقش دارد (۶). پلی پروتئین ناشی از بیان ORF1a و ORF1b در اثر فعالیت یک پروتئولیتیک ناشناخته به پروتئین‌های عملکردی شکسته می‌شود (۱۳ و ۱۷). ORF3 اولین عضو خانواده پروتئین‌های HSP 70 را که ۶۵ کیلودالتونی است تولید کرده و محصول ORF4 پروتئینی ۶۴ کیلودالتونی است که شبیه به توالی پروتئین HSP 90 دارد. ORF5 و ORF6 پوشش پروتئینی ویروس را تولید می‌کنند که به ترتیب ۲۲ و ۲۴ کیلودالتون وزن داشته و در حرکت سلول به سلول ویروس و نیز در مونتاژ ذره ویروس نقش ضروری بر عهده دارند (۱۰). ORF7 و ORF8 پروتئین‌هایی ۲۰ و ۲۱ کیلودالتونی تولید می‌کنند که شبیه به پروتئین همولوگ CTV هستند و پروتئین ۲۰ کیلودالتونی در حرکت سیستمیک و پروتئین ۲۱ کیلودالتونی به عنوان بازدارنده خاموشی ژن عمل می‌کند (۴ و ۶). در ساختار پیکره ویروس هیچ گونه لپید یا کربوهیدراتی گزارش نشده است (۱۹).

با این حال علائم BYV در جدایه‌هایی که بیماری‌زایی شدید

ویروس زردی چغندر قند (*Beet yellows virus, BYV*)، تقریباً در تمامی نقاط کشت این محصول در دنیا گسترده است (۲۰). این ویروس در سال ۱۹۴۰ به عنوان یک بیماری ویروسی شناخته شد (۲۶). خسارت ناشی از این بیماری‌های ویروسی بسته به رقم گیاه میزبان و زمان آلودگی بین ۴۷ تا ۶۰ درصد متغیر است (۲ و ۲۰). BYV گونه تیپ جنس *Closterovirus* از خانواده *Closteroviridae* می‌باشد و مانند سایر اعضای این خانواده محدود به آوند آبکش اند (۷). پیکره‌های ویروس، نخی و قابل ارتجاع بوده و حدود ۱۴۵۰-۱۲۵۰ نانومتر طول و ۱۰ نانومتر قطر دارد (۲ و ۱۴). ساختار پیکره‌ها دارای زیر واحدهایی است که در اطراف هاله‌ای تو خالی به فواصل حدود ۳/۴-۳ نانومتر مرتب شده‌اند (۲۱) و دارای ۸/۵ زیر واحد در هر ماریج می‌باشد (۹).

اسید نوکلئیک ویروس از نوع آر. ان. ا. تک رشته‌ای مثبت به طول ۱۴/۵ کیلو باز است که حدود ۵-۶ درصد از کل وزن ویروس را تشکیل می‌دهد. ژنوم BYV دارای نه چارچوب ژنی (ORF) می‌باشد

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی و استادیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
*نویسنده مسئول: (Email: Mohadese.gerami@yahoo.com)

این ویروس در این استان اقدام به انجام این تحقیق گرفته شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

طی بهار و تابستان سال ۱۳۹۲ تعداد ۴۸ نمونه از مزارع چغندر قند استان خراسان رضوی شامل فریمان، سبزوار، نیشابور، قوچان، تربت‌حیدریه و گناباد نمونه برداری انجام شد. نمونه دارای علائم شبه ویروسی مانند رگبرگ روشنی، زردی، ضخیم و شکننده شدن برگ‌ها و نقاط نکروتیک بر روی برگ‌ها بودند که پس از جمع‌آوری، بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان آزمایش در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا مستقیماً وارد آزمون مولکولی گردند.

استخراج آر.ان.ا. کل و آر.تی-پی سی آر

استخراج آر.ان.ا. کل و روش ژانگ و همکاران (۸) انجام شد. برای سنتز رشته مکمل (cDNA) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، ۳ میکرولیتر از آر.ان.ا. کل استخراج شده با ۲ میکرولیتر از آغازگر اختصاصی معکوس (جدول ۱) و ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط و میکروتیوب دردمای ۶۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس ۲ میکرولیتر مخلوط dNTPs، ۴ میکرولیتر بافر ۵x واکنش و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم نسخه بردار معکوس (Fermentase Reverse Transcriptase) به مخلوط اضافه گردیده و میکروتیوب به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه ترموسایکلر قرار گرفت (۲۵).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای طراحی شده مستقیم BYV-F و آغازگر معکوس BYV-R (جدول ۱)، برای تکثیر ژن پروتئین پوششی انجام شد. حجم نهایی این واکنش ۲۵ میکرولیتر شامل ۴ میکرولیتر از cDNA، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر 10x PCR buffer، ۱/۷۵ میکرولیتر (۵۰ میلی مولار) MgCl₂، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTPs و ۰/۲۵ میکرولیتر (۵ واحد در میکرو لیتر) Taq DNA Polymerase متعلق به شرکت پارس توس بود. پروفایل دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل یک چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه در مرحله واسرشت سازی، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از ترموسایکلر (بیومترا-آلمان) انجام گردید.

دارند، شامل شفاف شدن رگبرگ یا زرد شدن رگبرگ در برگ‌های جوان بوته‌های آلوده می‌باشد. شفاف شدن رگبرگ ممکن است زرد خیلی روشن یا ظاهری نکروتیک داشته باشد. رگبرگ‌های ثانوی و میانی برگ‌ها غالباً فرو رفته و علامت سیاه شدگی را نشان می‌دهند. بافت مربوط به رگبرگ‌ها در برگ‌های بیمار شده در تشکیل برجستگی رگبرگ‌ها نقشی ندارند ولی مزوفیل به طور قابل ملاحظه‌ای ضخیم می‌شود (۱۴، ۱۵ و ۱۶).

گسترده‌گی دامنه میزبانی ویروس زردی چغندر قند متوسط است. گرچه حداقل، گونه‌های ۱۵ خانواده و ۱۲۱ گونه از دولپه‌ای‌ها را آلوده می‌کنند (۱۸)، ولی اکثر میزبان‌های این ویروس در خانواده‌های *Amarantaceae*، *Aizoaceae*، *Chenopodiaceae* و *Caryophyllaceae* قرار دارند (۶ و ۱۱).

گرچه ویروس حداقل توسط ۲۲ گونه شته منتقل می‌شود ولی شته سبز هلو (*Myzus persicae*) و شته سیاه باقلا (*Aphis fabae*) از مهم‌ترین ناقلین ویروس عامل زردی چغندر قند هستند. انتقال به طریق نیمه پایا بوده و ناقلین ویروس را به مدت ۴-۱ روز نگه می‌دارند (۲۴). تاکنون نشانه‌ای دال بر دوره نهفتگی مشاهده نشده است. ناقلین ویروس عامل زردی چغندر قند را به نتاج خود منتقل نمی‌کنند و بعد از تعویض جلد عاری از ویروس می‌شوند. ویروس به روش‌های مکانیکی به سختی منتقل می‌شود (۱۲). این ویروس توانایی انتقال از طریق پیوند را نیز داراست اما هیچ گزارشی مبنی بر انتقال از طریق بذر و دانه کرده وجود ندارد (۲۲).

وجود بیماری زردی ویروسی در چغندر کاری‌های اراک، کرمانشاه، بروجرد، قزوین و همدان به اثبات رسیده است. ایزدپناه در سال ۱۳۶۱ این بیماری را در بعضی از مزارع فارس مشاهده نمود. در سال ۱۳۷۹ آلودگی مزارع چغندر قند به این ویروس را در نواحی شمالی استان خراسان مورد بررسی قرار گرفت و حضور این ویروس به وسیله آزمون سرولوژیکی تایید شد (۳، ۴ و ۵).

در میان روش‌های مختلفی که برای شناسایی و بررسی این ویروس وجود دارد، روش‌های مبتنی بر PCR-RT دارای دقت بالا بوده و مدت زمانی است که به عنوان روش پایه در شناسایی این ویروس مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۳) لذا در این تحقیق برای شناسایی ویروس مربوطه از این آزمون بهره برده شد.

استان خراسان رضوی با دارا بودن ۲۲۹۶۸ هکتار مساحت زیر کشت و تولید ۸۶۹۱۶۱ تن محصول بعد از استان آذربایجان غربی بزرگ‌ترین تولید کننده چغندر قند در ایران است. این استان تا سال ۱۳۸۶ رتبه نخست تولید چغندر قند در کشور را دارا بود (۴). از این‌رو نظر به این‌که استان خراسان رضوی در حال حاضر دومین تولیدکننده چغندر قند در کشور بوده (۱) و BYV از ویروس‌های مهم خسارت‌زا در این گیاه می‌باشد (۲۳) و با توجه به این‌که تاکنون در این استان تحقیق جامعی بروی این ویروس انجام نشده بود با هدف شناسایی

جدول ۱- پرایمرهای اختصاصی BYV در واکنش RT-PCR

نام پرایمر	توالی	طول	محل اتصال	شماره دسترسی جدایه
BYV_F	5'-ATGGGATCAGCTGAACCTAT-3'	۲۰	۱۳۶۴۰-۱۳۶۵۹	X73476
BYV_R	5'-TCATCTCCCGGTGCCTAGAC-3'	۲۰	۱۴۲۳۵-۱۴۲۵۴	X73476

نشان دادند در حالی که نمونه‌های جمع‌آوری شده از گناباد و قوچان فاقد آلودگی در آزمون مولکولی تشخیص داده شدند (شکل ۱). در میان نمونه‌های آلوده که در آن‌ها قطعه ۶۱۵ bp تکثیر و مشاهده شد، نمونه سبزواری جهت تعیین صحت قطعه تکثیر شده و نیز تعیین جایگاه فیلوژنتیکی این جدایه در مقایسه با جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن توسط شرکت ماکروژن (کره جنوبی) تعیین توالی شده و سپس در بانک جهانی با شماره دسترسی HX2000037145 ثبت گردید.

درصد شباهت بین جدایه خراسان رضوی (سبزواری) (S-J) و سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن در دو سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی در جدول ۲ آورده شده است.

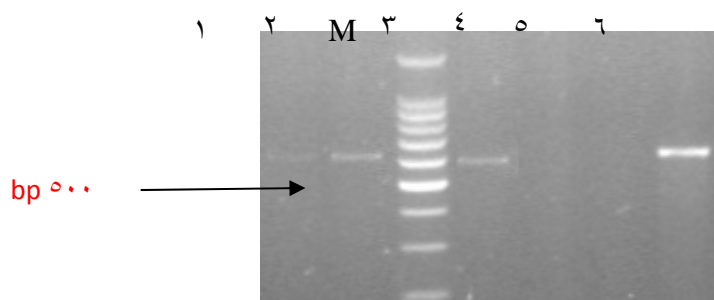
نتیجه تعیین توالی و مقایسه توالی بدست آمده با بانک ژن نشان داد که قطعه همانندسازی شده در واکنش RT-PCR توالی کامل ژن پروتئین پوششی ویروس زردی چغندر قند است. قطعه همانندسازی شده دارای بیشترین شباهت در سطح نوکلئوتیدی (۹۴/۷۹ درصد) و آمینواسیدی (۹۰/۵۹ درصد) با جدایه‌ای از اوکراین (X73476) بوده و کمترین شباهت در سطح نوکلئوتیدی (۸۵/۸۵ درصد) و آمینواسیدی (۸۲/۶۷ درصد) با جدایه‌ای از آمریکا (AF056575) می‌باشد. از آنجا که جدایه (IFFJ711759) متعلق به ایران (اصفهان) می‌باشد (۲۵)، لذا بدیهی است که جدایه خراسان رضوی (S-J) در هر دو سطح آمینواسیدی و نوکلئوتیدی به آن شبیه باشد. لیکن در مقیاس جهانی جدایه مورد بررسی ما به جدایه اوکراین شباهت دارد.

محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد حاوی ۲ میکرولیتر از Green viwer الکتروفورز و در نهایت در دستگاه ژل داک شرکت GenaFlash (اوکراین) عکس برداری شد. در میان نمونه‌های مثبت نمونه سبزواری به عنوان نماینده انتخاب و محصول PCR آن با PCR purification kit (Qiagen- Germany) خالص‌سازی شده، جهت تعیین ترادف به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال شد. هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی چارچوب ژنی پروتئین پوششی جدایه سبزواری با توالی ناحیه متناظر سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن به وسیله نرم افزار Clustalw2 و DNAMAN-7 انجام شد. درخت فیلوژنتیکی به وسیله نرم افزار MEGA 5 و بر اساس روش Neighbour-joining با ۱۰۰۰ بار تکرار رسم شد.

نتایج و بحث

واکنش آر تی - پی سی آر

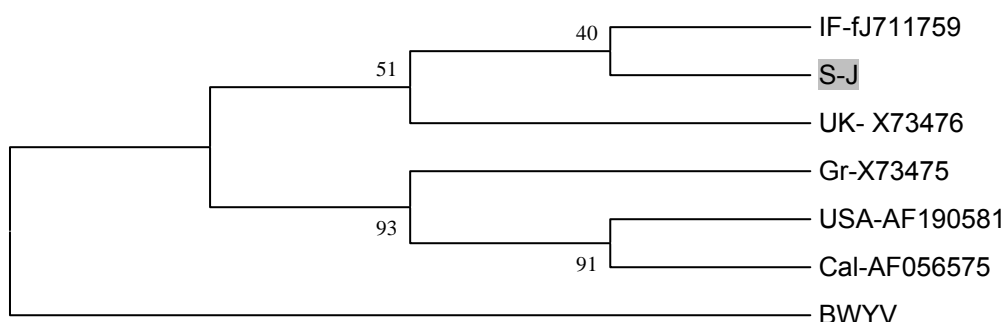
در واکنش آر تی - پی سی آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی چارچوب ژنی پروتئین پوششی قطعه‌ای به طول ۶۱۵ جفت باز در نمونه‌های آلوده به BYV تکثیر شد، در حالی که در نمونه گیاه سالم هیچ گونه بانندی مشاهده نشد. همانندسازی پروتئین پوششی ویروس در آزمون آر تی - پی سی آر تایید کننده آلودگی مزارع چغندر قند به ویروس زردی چغندر قند می‌باشد. نمونه‌های مربوط به شهرستان‌های تربت حیدریه (منطقه جلگه رخ)، فریمان، سبزواری و چناران آلودگی را



شکل ۱- قطعه تکثیر شده مربوط به ORF CP به اندازه ۶۱۵ bp در نمونه‌های آلوده به BYV. M مارکر (Fermentas, Cat No SM: 0321)، حضور باند در نمونه‌های آلوده چناران (۱)، تربت حیدریه (۲)، فریمان (۳) و سبزواری (۴) و عدم وجود آن در نمونه‌های گناباد (۵) و قوچان (۶).

جدول ۲- درصد شباهت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی جدایه خراسان رضوی (S-J) با جدایه‌های موجود در ژن بانک. (اعداد بالای قطر شباهت آمینواسیدی و اعداد پایین قطر شباهت نوکلئوتیدی را بر حسب درصد نشان می‌دهد).

نام و شماره دسترسی جدایه	IF-FJ711759	UK-X73476	USA-AF190581	Cal-AF056575	Gr-X73475	S-J-HX2000037145
IF-fJ71175	۱۰۰	۹۷/۴۵	۹۱/۸۴	۹۱/۸۴	۹۳/۸۸	۹۰/۲۱
UK-X7347	۹۹/۱۹	۱۰۰	۹۲/۶۵	۹۲/۶۵	۹۴/۶۱	۹۰/۵۹
USA-AF190581	۸۷/۳۷	۵۰/۴۸	۱۰۰	۹۹/۰۲	۹۸/۰۴	۸۳/۱۷
Cal-AF056575	۸۷/۳۱	۵۰/۴۶	۹۹/۸۳	۱۰۰	۹۸/۰۴	۸۲/۶۷
Gr-X73475	۸۷/۱۸	۸۷/۲۳	۹۷/۲۹	۹۶/۹۹	۱۰۰	۸۴/۶۵
S-J	۹۵/۲۶	۹۴/۷۹	۸۵/۸۵	۸۵/۸۵	۸۵/۸۵	۱۰۰



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس نرم افزار MEGA5 و توالی نوکلئوتیدی ژن CP ویروس BYV به روش Neighbour joining و ۱۰۰۰ تکرار. شماره دسترسی هر جدایه در مقابل آن نوشته شده است. RU (جدایه روسیه)، IF (جدایه اصفهان)، UK (جدایه اوکراین)، Gr (جدایه آلمان)، USA (جدایه آمریکا) و Cal (جدایه کالیفرنیا) است. جدایه مورد بررسی با رنگ خاکستری مشخص شده و BWYV-EU636991 به عنوان Out Group استفاده شده است.

جغرافیایی است. البته از آنجا که تعداد جدایه‌های تعیین توالی شده در سطح دنیا محدود و منحصر به نقاط خاصی هستند، لذا امید می‌رود با شناسایی و تعیین توالی جدایه‌های این ویروس در دیگر نقاط دنیا مورد روابط فیلوژنتیکی آن‌ها بهتر نتیجه گیری کرد.

بر اساس درخت فیلوژنتیکی (شکل ۲) جدایه خراسان به همراه دیگر جدایه ایرانی IF(FJ711759) (۲۵) در یک زیر گروه قرار دارند و به همراه جدایه اوکراین در یک گروه واحد قرار می‌گیرند. این امر بیانگر آن است که شباهت بین جدایه‌ها تا حد زیادی وابسته به قرابت

منابع

- ۱- آمارنامه کشاورزی، ۱۳۹۰-۱۳۸۹، دفتر آمار و فن‌آوری وزارت جهاد کشاورزی
- ۲- ارجمند م.ن. ۱۳۷۷. بیماری‌های چغندر قند (۳۴۲-۳۵۷)، در "چغندر از علم تا عمل" تألیف دی.ا.کوک و اسکات، چاپ اول، نشر علوم کشاورزی، تهران.
- ۳- اسکندری ف، آل آقا ن، حجارود ق. و همتی ک. ۱۳۴۸. بیماری‌های چغندر قند در ایران. نشریه شماره ۱۰۶ گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.
- ۴- ذبیح نیا مقدم ع، جعفرپور ب، فلاحتی رستگار م. و گرایلی ن. ۱۳۸۹. بررسی آلودگی و تعیین پراکنش ویروس زردی چغندر قند (BYV) در مزارع خراسان رضوی، حفاظت گیاهان جلد ۲۴، شماره ۳، ۲۵۷-۲۵۲.
- ۵- ایزدیناه ک. ۱۳۶۱. لیست مشروح بیماری‌های ویروسی و شبه ویروسی در فارس، جهاد دانشگاهی شیراز، شیراز.
- 6- Agranovsky A.A., and Lesemann D.E. 2000. Beet yellows virus. CMI/AAB Descriptions of Plant viruses: No. 377.
- 7- Bennett C.W. 1960. Interactions of sugar-beet curly top virus. journal of Virology, 3: 322-342.
- 8- Chang S., Puryear J., and Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolation RNA from Pine trees. Journal of Plant Molecular Biology, 11: 113-116.

- 9- Chevallier D., Engerl A., Wurtz M., and Putz C. 1983. The structure and characterization of a closterovirus, Beet yellows virus, and a luteovirus, Beet mild yellowing virus, by scanning transmission electron microscopy, optical diffraction of electron image and acrylamide gel electrophoresis. *Journal of Gen Virology*, 64: 2289-2293.
- 10-Dolja V.V., Kreuze J.F., and Valkonen J.P. 2006. Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Journal of Virus Research*, 117: 38-51.
- 11-Dolja V.V. 2003. Beet yellows virus: the importance of being different. *Journal of Molecular Plant Pathology*, 4: 91-98.
- 12-Duffus J.E. 1973. The yellowing virus diseases of Beet. *Journal of Virus Research*, 8: 347-386.
- 13-Erokhina T.N., Zinovkin R.A., Vitushkina M.V., Jelkmann W., and Agranovsky A.A. 2000. Detection of Beet yellows closterovirus methyltransferase-like and helicase-like proteins in vivo using monoclonal antibodies. *Journal of Gen.Virology*, 81, 597-603.
- 14-Esau K. 1960. The development of inclusions in sugar beets infected with the Beet yellows virus. *Journal of Virology*, 11: 317-320.
- 15-Esau K., Cronshaw J., and Hoefert L. 1967. Relation of beet yellows virus to the phloem and to movement in the sieve tube. *Journal of Gel Biology*, 32: 71-87.
- 16-Esau K. 1960. Cytologic and histologic symptoms of Beet yellows, *Journal of Virology*, 10, 73-85.
- 17-Gushchin V.A., Solovyev A.G., Erokhina T.N., Morozov S.Y., and Agranovsky A.A. 2013. Beet yellows virus replicase and replicative compartments: parallels with other RNA viruses. *Journal of Microbiology*, 4:1-6.
- 18-Hull R. 2009. *Comparative Plant Virology*. 2nd ed. Elsevier Academic Press publications.
- 19-King A., Adams M.J., Carstens B.E., and Lefkowitz E.J. 2012. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press publications.
- 20-Koeijer K.J., and Werf V.W. 1999. Effects of Beet yellows virus and Beet mild yellowing virus on leaf area dynamics of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Field Crops Research*, 61: 163-177
- 21-Russell G.E., and Bell J. 1963. The structure of beet yellows virus filaments. *Journal of Virology*, 21: 283-284.
- 22-Smith H.G., and Karasev A. 1991. Homepage of Plant Viruses Online, Descriptions and Lists from the VIDE Database. Beet yellows closterovirus Available online at <http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr093.htm>.
- 23-Sтивен S.M., Hull R., and Smith H.O. 1997 Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of Beet yellows closterovirus in plant and aphids. *Journal of Virology Methods*, 68: 9-16.
- 24-Sylvester E.S. 1956. Beet yellows virus transmission by the green peach aphid. *Journal of Economic Entomology*, 49, 789-800.
- 25-Tabejamaat Z., Massah A., and Ahoonmanesh A. 2013, Molecular Analysis of ORF6, ORF7 and ORF8 of Beet yellows virus Iranian Isolate. *Journal of Phytopathology*, 161: 574-577.
- 26-Watson M.A. 1940. Studies on the transmission of sugar Beet yellows virus by the aphid, *Myzus persicae*. *Proceeding of the Royal Society*, 128:535-542.